

Endocrinologie de la gestation chez la vache : signaux embryonnaires, hormones et protéines placentaires

AYAD¹ A., SOUSA¹ N.M., HORNICK² J.L., TOUATI³ K., IGUER-OUADA⁴ M., BECKERS¹ J.F.

- 1 Département des Sciences Fonctionnelles, Service de Physiologie de la Reproduction Animale, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège, B-4000 Liège, Belgique
- 2 Unité de Nutrition, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège, B-4000 Liège, Belgique
- 3 Département des Sciences Cliniques, Pôle Ruminants-Porcs, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège, B-4000 Liège, Belgique
- 4 Département de Biologie des Organismes et des Populations, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Abderahmane Mira, 06000, Béjaia, Algérie

Correspondance: Prof. J.F. Beckers, Tél. +32(0)4/3664161, Fax. +32(0)4/3664165, Email: jfbeckers@ulg.ac.be

RESUME : Le développement, l'implantation et la survie embryonnaire à des stades précoces de la gestation sont dépendants d'une communication embryo-maternelle intime. La partie embryonnaire est constituée principalement par le trophoblaste, ou futur placenta, qui joue un rôle primordial dès les premiers stades de la gestation. Le placenta émet de nombreux signaux de natures chimiques diverses (stéroïdes, prostaglandines, peptides, protéines) dont certains, comme l'interféron tau, déterminent le maintien du corps jaune en début de gestation. Jusqu'à présent, bien qu'ayant fait l'objet de nombreuses spéculations, les plus précoces de ces signaux n'ont pas été identifiés dans la circulation périphérique maternelle. Cependant, des protéines spécifiques, dites associées à la gestation, ont été découvertes dès les années'80. Ces dernières sont synthétisées par les cellules trophoblastiques et sont utilisées comme moyen de gestion des élevages. Leur avantage est que la plupart de ces molécules se retrouvent dans la circulation périphérique. Nous décrivons dans cette revue de littérature les principaux mécanismes associés à la reconnaissance maternelle de la gestation chez la vache et leurs applications éventuelles dans le diagnostic de gestation.

INTRODUCTION

Chez les mammifères, le blastocyste définit, par un processus d'implantation dans l'organisme maternel, une structure qui va permettre le développement embryonnaire au cours de la gestation : le placenta.

Organe autonome et transitoire, le placenta cumule des fonctions qui, chez l'adulte, sont assurées par le poumon, les reins et l'intestin. Il nourrit, oxygène et épure l'embryon, puis le fœtus, tout au long de la vie intra-utérine. En

outre, dans la plupart des espèces et en particulier chez les ruminants, le placenta possède une fonction endocrine indispensable à l'initiation et au maintien de la gestation ainsi qu'à la croissance fœtale.

Le placenta synthétise abondamment des hormones, des neuromédiateurs et des facteurs de croissance indispensables à l'équilibre hormonal de la gestation et à la régulation de sa propre croissance et de celle du fœtus. Il peut être défini comme étant l'apposition et/ou la fusion de cellules épithéliales de l'endomètre et du trophoblaste

destinées à établir un contact intime entre la mère et le fœtus. Chez les ruminants, l'enveloppe la plus externe du *conceptus*, le chorion, présente sur sa surface externe des microvillosités cotylédonaires qui s'engrènent dans des formations spécialisées de la muqueuse utérine pour donner naissance aux placentomes, véritables surfaces d'attache uteroplacentaire. Les espaces intercotylédonaires lisses forment le paraplacenta. L'ensemble des éléments, placentomes et paraplacenta, concourt à former le placenta dans son entièreté.

1. Le développement embryonnaire

La pénétration de l'ovocyte par le spermatozoïde donne lieu à un œuf fécondé ou zygote. Chez les mammifères, le zygote entreprend ses divisions (2, 4, 8 et 16 blastomères) en même temps que sa descente vers l'utérus le long de l'oviducte. Le devenir du développement embryonnaire dépend de l'établissement de relations intimes entre l'endomètre et l'embryon par l'intermédiaire du placenta.

Pendant la phase de vie libre dans la lumière utérine, la taille de l'embryon augmente considérablement avec parallèlement une différenciation remarquable des blastomères. Ainsi, à partir du stade de 32-64 cellules, les divisions donnent naissance à deux types de cellules : des cellules internes apolaires et des cellules externes polaires. La lignée cellulaire interne est à l'origine du bouton embryonnaire ou masse cellulaire interne, qui donnera essentiellement origine au futur fœtus. La lignée externe génère le trophoblaste, qui apparaîtra comme un épithélium aplati dont les cellules sont réunies entre elles par divers complexes jonctionnels bien développés.

2. Implantation

Après la phase de vie libre dans la corne utérine, le blastocyste se fixe sur l'endomètre et s'y implante plus ou moins profondément selon les espèces animales. En général, l'implantation se déroule selon une succession d'étapes caractérisées par des degrés divers de contact entre le tissu maternel et fœtal, soit : l'orientation du blastocyste et l'accolement, l'apposition du blastocyste éclos à la muqueuse utérine, l'adhérence des cellules du trophoctoderme aux cellules de la muqueuse utérine et l'invasion de l'endomètre (Guillomot, 2001). Au début du processus d'implantation, en fonction de l'espèce, les microvillosités cellulaires vont établir les premiers contacts avec l'épithélium maternel, soit à partir du 19^e - 20^e jour de gestation chez la vache. L'étape d'adhérence des membranes représente la phase ultime du processus implantaire chez les espèces à placentation épitheliochoriale (trouie, jument). Chez

les autres espèces, l'implantation est plus invasive, conduisant au niveau histologique à différents types de placenta en fonction du degré de pénétration dans l'épaisseur de la paroi utérine : synépitheliochorial (vache, brebis), endothéliochorial (carnivores) et hémochorial (rongeurs et primates) (Guillomot, 2001).

3. Les cellules binucléées

Les cellules binucléées dérivent des cellules uninucléées trophoblastiques, mais elles se distinguent de ces dernières par le nombre de noyaux (Wooding, 1992). Ces cellules se caractérisent par un cytoplasme dense, riche en ribosomes, parsemé de grosses granulations et par la présence d'un appareil de Golgi très développé (Bjorkman, 1954). Elles se trouvent très proches de la jonction fœto-maternelle qu'elles peuvent traverser. La caractéristique la plus remarquable des cellules binucléées est leur capacité à migrer dans l'épithélium utérin (Wooding et Wathes, 1980) (figure 1). Au niveau du trophoctoderme, le nombre des cellules binucléées augmente jusqu'à un maximum de 20 % des cellules trophoblastiques, cette proportion reste ensuite constante jusqu'à la mise bas (Boshier, 1969).

Les cellules binucléées sont directement impliquées dans la production de la progestérone (Wango *et al.*, 1992 ; Wooding *et al.*, 1996), des prostaglandines (Reimers *et al.*, 1985), de l'hormone lactogène placentaire (Verstegen *et al.*, 1985 ; Wooding, 1992) et des glycoprotéines associées à (ou spé-

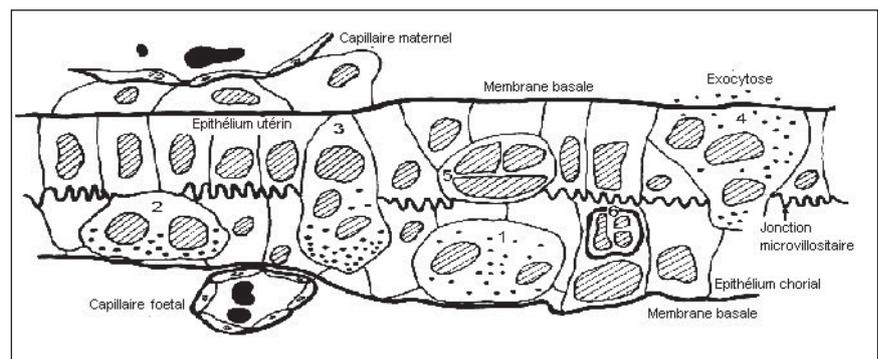
cifiques de) la gestation (Zoli *et al.*, 1992a ; Atkinson *et al.*, 1993). Ces produits de synthèse sont stockés dans des granules denses occupant plus de 50 % du cytoplasme (Lee *et al.*, 1986) et relargués directement dans la circulation maternelle après migration des cellules binucléées (Wooding, 1984). Ceci confère au placenta le rôle d'une glande endocrine produisant diverses molécules.

4. Signaux embryonnaires de la gestation

4.1. Early pregnancy factor

Dès les années '70, Morton et collaborateurs (1974) ont rapporté les premiers travaux concernant l'existence de l'EPF dans le sang maternel, ces auteurs ont observé une accélération de l'inhibition de formation de rosette (TIR) après l'addition d'un sérum en provenance de souris, prélevé quelques heures seulement après la fécondation, suggérant ainsi une expression très précoce de ce facteur (1 à 24 heures post-fécondation) (Morton *et al.*, 1987). Ensuite, plusieurs investigations ont été réalisées sur base du test de la rosette afin de détecter la présence de ce facteur immunomodulateur dans le sang maternel de nombreuses espèces. Dix ans plus tard, Cavanagh et collaborateurs (1984) ont formulé une hypothèse selon laquelle la pénétration du spermatozoïde dans l'ovocyte donnerait lieu à la production d'une substance, la zygotine, qui, dans les premières heures du développement de l'œuf, stimulerait la pro-

Figure 1. Représentation schématique de la migration des cellules binucléées chez la vache : 1) cellule binucléée ; 2) contact avec les microvillosités ; 3) fusion avec les cellules maternelles et formation de cellules trinucléées à vie courte ; 4) exocytose des granules ; 5) cellules trinucléées présentant un cytoplasme réduit et un nucleus dense ; 6) cellule réabsorbée par le trophoctoderme (d'après Wooding et Wathes, 1980).



duction par l'ovaire porteur du corps jaune d'un facteur appelé EPF (*Early Pregnancy Factor*). Selon Cavanagh (1984), l'EPF serait la résultante de l'association de deux éléments : l'EPF A, secrété par l'oviducte uniquement pendant la gestation, et l'EPF B, secrété par l'ovaire porteur du corps jaune gestatif.

Malgré les résultats préliminaires encourageants du point de vue de l'intérêt considérable d'un diagnostic de gestation précoce chez les mammi-fères domestiques, l'utilisation de ce test s'est avérée peu convaincante et d'une faible efficacité dans les études scientifiques. L'évaluation sur le terrain d'un test (ECF Dip Stick Test : Concepto Diagnostics, Knoxville, USA) en a démontré les faibles spécificité (26 %), sensibilité (81 %), valeurs prédictive positive (40 %) et négative (69 %) (Cordoba *et al.*, 2001). Le même test a été simultanément utilisé par le groupe de Scott Willard à l'Université du Mississippi (Gandy *et al.*, 2001) lequel a évalué la détection de la non gestation entre les périodes allant des 1^e au 3^e jours et des 7^e au 9^e jours après insémination artificielle (IA) chez des génisses appartenant à la race Holstein. Dans cette expérience, les auteurs ont réussi à identifier seulement 44 % de génisses non gestantes entre les 1^e et 3^e jours, et 56 % entre les 7^e et le 9^e jours. Ils ont démontré aussi que les résultats changeaient suivant que le sérum était frais ou congelé, ou encore suivant que le test était réalisé sur des échantillons de sérum ou sur le lait. Entre les 3^e et 30^e jours, une plus grande incidence de faux positifs a été identifiée dans du sérum (47,5 %) que dans du lait (31,3 %).

Selon la littérature récente, la faible fiabilité de ce test (ECFTM) et du test TIR constituent un argument contre leur éventuelle utilisation dans la pratique vétérinaire car les résultats obtenus jusqu'à présent, peuvent, au mieux, être comparés à un diagnostic de gestation ou de non gestation hasardeux.

En revanche, Cheng et collaborateurs (2004) ont suggéré que l'activité de l'EPF dans le mucus cervical de la

femme pourrait être utilisée pour l'évaluation de la réussite d'un transfert et de la qualité de l'embryon. Cette hypothèse devrait être confirmée par d'autres auteurs et notamment dans des études de type épidémiologique.

L'EPF a été montré en relation étroite avec la gestation (Athanasas *et al.*, 1991 ; 2000), mais son existence n'est pas limitée uniquement à celle-ci. L'EPF est secrété par les cellules tumorales durant les phases de croissance et de division (Quinn *et al.*, 1990), également par les cellules normales prolifératives chez l'adulte (Quinn *et al.*, 1994) et par les plaquettes activées (Cavanagh *et al.*, 1991). Des investigations menées pour caractériser la structure de l'EPF se sont vues, à ce jour, peu concluantes. Cavanagh et Morton (1994) ont montré qu'au moins 70 % de la séquence en acides aminés de la molécule EPF sont identiques à la protéine de choc thermique. Selon Ohnuma et collaborateurs (2004), l'EPF chez la jument est similaire à celui identifié dans le sérum d'une vache gestante. Quant au rôle de l'EPF, Athanasas-Platsis et collaborateurs (1989) ont décrit que l'immunisation passive de souris par injection d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux dirigés contre cette molécule induirait une réduction de plus de la moitié du taux de gestation obtenu par le groupe contrôle au 10^e jour post-fécondation. Il se pourrait que ce facteur contribue à diminuer l'immunocompétence des lymphocytes en début de gestation et ainsi à faciliter la tolérance immunologique de l'embryon par l'organisme maternel (Morton *et al.*, 1983). En même temps que facteur immunosuppresseur (Morton *et al.*, 2000 ; Zhang *et al.*, 2000), cette molécule interviendrait également en tant que facteur de croissance (Morton *et al.*, 1992 ; Morton, 1998), cependant, cette hypothèse n'a pas été confirmée par d'autres équipes. Par ailleurs, de récentes publications ont rapporté dans une expérimentation d'encéphalomyélite autoimmune qu'un traitement par l'EPF recombinant réduit le nombre de lymphocytes et macrophages dans le système nerveux central (Athanasas-Platsis *et al.*, 2003 ; Harness *et al.*, 2003).

À la même époque, les résultats de l'équipe de Zhang et collaborateurs (2003) indiquent que la suppression des mécanismes immunologiques par l'EPF jouerait un rôle dans la réduction des signes cliniques de la maladie encéphalomyélite autoimmune. L'ensemble des connaissances relatives à l'EPF fait apparaître que malgré l'intérêt considérable que présente cette molécule, il reste de nombreux points à clarifier. Sur le plan de l'application pratique du test ECF comme diagnostic de gestation, il est clair que les publications les plus récentes font apparaître un manque flagrant de fiabilité chez les bovins (Cordoba *et al.*, 2001 ; Gandy *et al.*, 2001).

4.2. Interféron tau

La diminution du nombre de récepteurs utérins à l'ocytocine et aux œstrogènes ainsi que la réduction de la synthèse de la prostaglandine F2 alphaPGF2 α constituent les principaux changements observés lors de la gestation notamment dans ses premiers stades. L'interféron tau (IFN- τ) est fortement impliqué dans ce double mécanisme du maintien de la gestation.

L'existence d'un facteur anti-lutéolytique produit par le *conceptus* ovin a été observée dès 1966 par Moor et Rowson. Ces derniers, après avoir transféré des embryons ovins âgés de 14 à 16 jours sur des brebis cyclées avant le 12^e jour du cycle oestral, ont observé le maintien du corps jaune et l'interruption du cycle oestral. Les premiers travaux qui ont montré que le *conceptus* inhibe la lyse du corps jaune sont ceux de Rowson et Moor (1967). Plus tard, en 1979, Martal et collaborateurs ont montré que l'administration d'homogénats de trophoblastes âgés de 14 à 16 jours maintenaient le corps jaune pendant plusieurs mois chez des brebis non gravides. Par contre, des homogénats de trophoblastes âgés de 21 à 23 jours ne le maintenaient pas. Ils ont conclu que l'embryon émettait un signal particulier temporaire qui permettait le maintien du corps jaune. Martal et collaborateurs (1979) estimaient qu'il s'agissait d'effet anti-lutéolytique dû à une protéine qu'ils ont mise en évidence au 12^e jour de gestation chez la

brebis. Le signal dénommé initialement trophoblastine est une protéine qui présente des différences de structure avec la prolactine (PRL) et la LH, lesquelles interviennent aussi dans le maintien du corps jaune mais par un autre mécanisme. La détermination de la séquence en acides aminés de la protéine trophoblastique produite par l'embryon ovin a révélé une grande analogie avec les interférons (Imakawa *et al.*, 1987 ; Charpigny *et al.*, 1988 ; La Bonnardière *et al.*, 1991). Par ailleurs, elle présente les mêmes propriétés antivirales, anti-prolifératives et immunosuppressives que les interférons (Martal et Cédard, 1993) et se lie à leurs récepteurs (Roberts, 1989). Cela a justifié la nouvelle appellation d'interféron tau (IFN- τ). Quoi qu'il en soit, la trophoblastine ou IFN- τ a été identifiée dans le liquide de lavage de la cavité utérine dès le 12^e jour de gestation chez la vache (Humboldt et Dalla-Porta, 1984 ; Bazer, 1989). Morgan et collaborateurs (1993) ont démontré ultérieurement qu'elle est synthétisée par des cellules mononucléées du trophoctoderme et exclusivement sécrétée dans la lymphe locale, où elle exerce son effet antilutéolytique (Roberts *et al.*, 1992). Bien qu'une augmentation de la concentration en ARNm d'IFN- τ bovin puisse être détectée dès le jour 9 à 10 de gestation (Kubisch *et al.*, 2001), sa production à grande échelle est limitée aux jours 17 à 19 (Farin *et al.*, 1990), quand le *conceptus* subit l'expansion rapide de sa forme.

L'IFN- τ induit localement au niveau de l'utérus l'inhibition des sécrétions de PGF_{2 α} et diminue la sensibilité du corps jaune à l'action lutéolytique de cette hormone. Le mécanisme d'action de l'IFN- τ inclut l'inhibition des récepteurs à l'œstradiol, la réduction conséquente des récepteurs d'ocytocine (Asselin et Fortier, 2000), pourrait diminuer la synthèse de PGF_{2 α} par les cellules endométriales stromales de vache en réduisant l'expression d'une oxydoréductase qui transforme la PGE₂ en PGF_{2 α} et augmenter la synthèse préférentielle de PGE₂ comparativement à la PGF_{2 α} . Ce dernier phénomène résulte en une modification du milieu utérin, laquelle se traduit

notamment par une synthèse de plusieurs protéines endométriales essentielles à la survie et au développement de l'embryon (Hansen *et al.*, 1999). Malgré l'importance de l'IFN- τ dans l'établissement de la gestation chez la vache, cette protéine ne présente pas d'intérêt en tant que test diagnostique de gestation car aucune méthode ne permet de la détecter dans la circulation sanguine maternelle.

5. Hormone lactogène placentaire

Le placenta produit une hormone lactogène placentaire (PL), connue également sous le nom hormone chorionique somato-mammotrope (CS). Cette hormone présente une homologie structurelle et fonctionnelle avec l'hormone de croissance (GH) et la prolactine (PRL).

Les premières publications qui ont rapporté l'existence d'une hormone placentaire à activité endocrine multiple remontent aux travaux de Selye et collaborateurs (1933) lesquels, dès cette époque, ont montré chez la rate le rôle non essentiel de l'hypophyse dans le maintien de la gestation et le déclenchement de la lactation. Ensuite, Contopoulos et Simpson (1959) ont suggéré la présence dans le placenta d'une substance exerçant des propriétés somatotropes. La présence d'une hormone lactogène placentaire a été mise en évidence chez plusieurs espèces tels que la souris (Cerutti et Lyons, 1960), la femme (Josimovich et McClaren, 1962), la chèvre (Buttle *et al.*, 1972), la brebis (Handwerger *et al.*, 1974 ; Martal et Djiane, 1975 ; Chan *et al.*, 1976 ; Reddy et Walkins, 1978), le rat (Robertson *et al.*, 1991), et le hamster (Sakal *et al.*, 1998). Mais, cette hormone n'est pas retrouvée chez la jument, la truie et les carnivores (chatte, chienne). Chez la vache, l'existence d'une réponse lactogénique au niveau des cotylédons à des stades gestatifs divers a été décrite pour la première fois en 1976 par Buttle et Forsyth. Après cinq jours de culture, ces auteurs ont obtenu une réponse lactogénique correspondant à environ 300 ng de prolactine bovine par millilitre de milieu.

La purification et la caractérisation de l'hormone lactogène placentaire bovine (bPL) en tant que glycoprotéine, ont été réalisées par plusieurs équipes (Beckers *et al.*, 1980 ; Murthy *et al.*, 1982 ; Arima et Bremel, 1983). Cette glycoprotéine possède plusieurs isoformes de masses moléculaires s'étalant de 30 à 34 kDa, elle est sécrétée par les cellules binucléées et trinucélées du placenta. Contrairement aux hormones lactogènes placentaires des autres espèces, le lactogène placentaire bovin apparaît comme fortement glycosylé (Shimomura et Bremel, 1988), ce qui se traduit par une masse moléculaire élevée avec imprécision de son estimation dans des conditions dénaturantes. Le bPL présente 48 à 50 % de similarité avec la prolactine bovine et 23 à 28 % avec l'hormone de croissance (Yamakawa *et al.*, 1990 ; Schuler *et al.*, 1991). Malgré ces homologues, l'utilisation du dosage radioimmunologique développé par Beckers et collaborateurs (1982) a démontré l'absence de réaction croisée entre le bPL, la prolactine et l'hormone de croissance bovine. Selon Verstegen et collaborateurs (1985), de 90 à 95 % des cellules binucléées (BNC) sont intensément marquées pour la bPL et cela à partir du 90^e jour de gestation. Le bPL est localisé exclusivement au niveau des granules de sécrétion et du complexe de Golgi des cellules binucléées et trinucélées présentes au niveau de la jonction microvillositaire (Wooding et Beckers, 1987).

Le dosage radioimmunologique (RIA) du bPL a été décrit par Beckers et collaborateurs (1982) pour mesurer les concentrations de l'hormone chez les vaches et leurs fœtus. Le bPL devient dosable dans le sérum maternel à un moment très variable selon les individus allant du 26^e au 110^e jour après fécondation. Les concentrations maternelles de bPL augmentent progressivement pour atteindre les valeurs de 1 à 2 ng/ml aux environs de la parturition. Ces concentrations restent toutefois 100 à 1000 fois inférieures à celles des autres espèces étudiées (Bremel et Schuler, 1987). Les faibles concentrations maternelles contrastent aussi avec celles observées chez le

fœtus, lesquelles varient de 25 à 30 ng/ml au 90^e jour pour ensuite diminuer graduellement et rester à 5 ng/ml à la période prénatale (figure 2). Des investigations menées par l'équipe de Guilbault et collaborateurs (1988) sur des vaches receveuses d'embryons transférés, ont montré que la concentration maternelle de bPL est fonction de la race et du type de croisement des produits. En effet, les concentrations observées montrent que les races de la vache porteuse et du fœtus jouent un rôle important sur les concentrations maternelles. Cependant, la taille du fœtus et le poids du veau à la naissance n'ont pas d'influence significative sur les concentrations périphériques de bPL (Patel *et al.*, 1996).

La liaison du bPL à des récepteurs présents dans la glande mammaire, le foie, l'endomètre et le corps jaune a été démontrée par Beckers (1983). Dans la glande mammaire, le bPL paraît exercer une influence sur le développement du tissu lobulo-alvéolaire. Sa capacité lactogène a été démontrée *in vitro* par Forsyth (1986). D'après Hayden et collaborateurs (1979), la production laitière chez les ovins est corrélée avec la sécrétion de l'hormone entre la 11^e semaine de gestation

et la mise-bas. L'apparition tardive de l'hormone lactogène placentaire dans le sang maternel des bovins confère toutefois à ce dosage peu d'intérêt pour le diagnostic de gestation et restreint son utilisation à un diagnostic tardif de gestation.

6. Protéines associées à (ou spécifiques de) la gestation

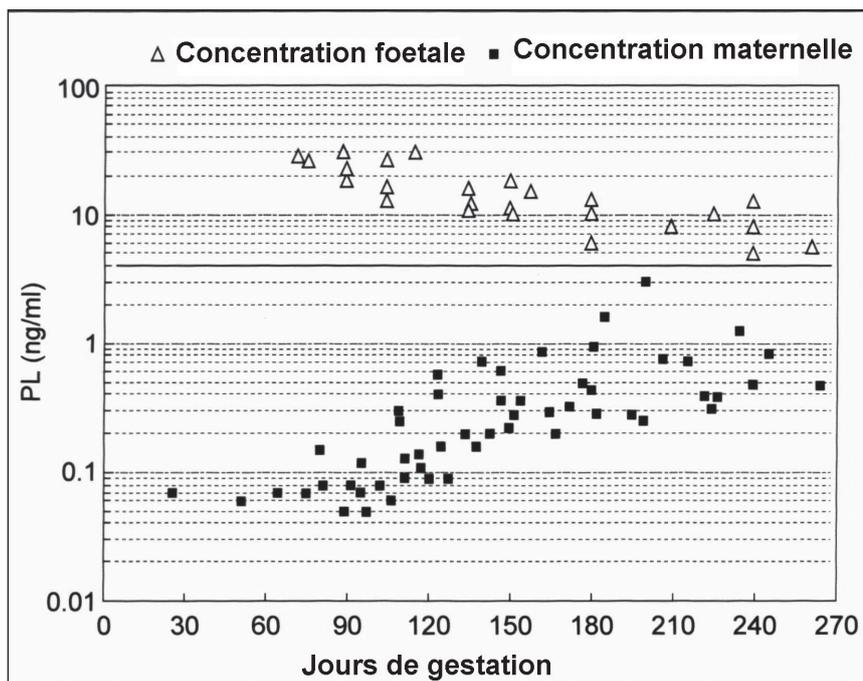
6.1. Généralités sur les protéines associées à la gestation (PAG)

Les premières publications sur les protéines spécifiques de la gestation (PSP) (ou associées à la gestation PAG) ont été décrites dans les années '80, sous diverses appellations (PSPB, PSP-60, PAG, SUB-3). L'existence de protéines associées à la gestation et faisant partie du groupe des protéases aspartiques apparaît commune aux différentes espèces de ruminants, elle se retrouve également chez le porc (Szafranska *et al.*, 1995; Doré *et al.*, 1996; Do *et al.*, 2001; Szafranska *et al.*, 2001; Szafranska *et al.*, 2002). Des séquences de cDNA similaires ont été identifiées chez le cheval (Green *et al.*, 1999), le chat (Gan *et al.*, 1997), et la souris (Chen *et al.*, 2001).

En 1982, Butler et collaborateurs ont isolé à partir du placenta bovin deux protéines spécifiques de la gestation qu'ils ont dénommées *Pregnancy Specific Protein A* et *B* (PSPA et PSPB). La PSPA, une protéine de masse moléculaire apparente de 65 à 70 kDa et présentant des points isoélectriques pI de 4,0 à 4,4, s'est révélée ultérieurement identique à l'alpha fœtoprotéine (AFP), une protéine synthétisée par le foie du fœtus et le sac vitellin de tous les mammifères (Giltlin et Boesman, 1967). Les concentrations sériques maternelles d'AFP sont élevées pendant la gestation chez de nombreuses espèces animales. Des concentrations non négligeables de cette protéine sont détectables en dehors de la gestation, lesquelles empêchent l'utilisation de leur dosage comme moyen de diagnostic de gestation.

La PSPB est une glycoprotéine de masse moléculaire apparente de 47 à 53 kDa et présentant des variants isoélectriques de pI 4,0 à 4,4. La PSPB n'a pas été caractérisée au niveau de sa séquence en acides aminés au moment de sa découverte. Cependant, il a été rapidement montré que cette protéine est présente dans le sang maternel et que son dosage pouvait permettre un diagnostic de gestation chez les femelles de nombreuses espèces de ruminants (Sasser *et al.*, 1989). À la même époque, Beckers et collaborateurs (1988a) ont isolé deux protéines placentaires. La première a été caractérisée par Zoli et collaborateurs (1991) et dénommée PAG1 (*Pregnancy Associated Glycoprotein 1*) c'est-à-dire « associée à » et non « spécifique de » la gestation parce qu'elle a été également retrouvée dans les gonades et qu'elle a été détectée dans le sérum chez les mâles et les femelles non gestantes. La PAG1 est une glycoprotéine acide de masse moléculaire de 67 kDa. Elle présente 4 isoformes de pI : 4,4; 4,6; 5,2 et 5,4. La seconde protéine de 30 kDa de masse moléculaire possède des points communs avec la LH : liaison aux récepteurs du corps jaune, parenté immunologique et même comportement au cours de la purification. Ils l'ont nommée bCG (*bovine Chorionic Gonadotropin*)

Figure 2. Profils plasmatiques de l'hormone lactogène placentaire bovine chez la mère et le fœtus (d'après Beckers *et al.*, 1982).



(Beckers *et al.*, 1988b). Par la suite, cette protéine a été étudiée en profondeur et considérée comme faisant partie de la famille des glycoprotéines spécifiques (de) ou associées à la gestation et a été appelée bPAG-2 (Xie *et al.*, 1994). PAG 1 et 2 présentent 58 % d'identité de séquence, cependant, aucune réaction croisée n'a été détectée du point de vue immunologique. Ensuite, Lynch et collaborateurs (1992) ont montré par clonage moléculaire qu'une forme de la PSPB est, par sa structure primaire, apparentée à la PAG1. Aujourd'hui, dans les banques génomiques, la bPAG-1 (Zoli *et al.*, 1991) et la PSPB (Butler *et al.*, 1982) sont considérées comme ayant la même séquence en acides aminés. Il en est probablement de même pour la PSP-60 et le SUB-3. Parallèlement aux travaux de Butler et collaborateurs (1982) et de Sasser et collaborateurs (1989), des équipes de chercheurs se sont intéressées à l'aspect de la sécrétion dans le sang maternel et au développement de dosage, en l'occurrence pour la PAG (Zoli *et al.*, 1991) et la PSP-60 (Mialon *et al.*, 1993).

Récemment, au moyen de l'analyse *microarray* d'ADN, Ushizawa et collaborateurs (2004) ont démontré que plusieurs molécules de PAG sont exprimées dès les jours 7 à 14 de gestation (boPAG-11, -16, -17), jours 14 à 21 (boPAG-1, -5 à -7, -9 à -13, -15 à -17, -19, -21) ou même avant (jour 7: par exemple boPAG-4, -5 et -6). Cependant, la plupart de ces protéines n'ont pas été purifiées et ne sont pas encore disponibles pour le développement de radioimmunoassay (RIA) ni d'enzymo immunoassays (ELISA). Des investigations par le clonage moléculaire et par séquençage nucléotidique ont permis de montrer que les protéines de la gestation, isolées chez les différentes espèces, font partie de la grande famille des protéases aspartiques où elles coexistent avec le pepsinogène, la pepsine, la chymosine, les cathepsines D et E, et la rénine (Xie *et al.*, 1991). Cependant, la majorité de ces PAG sont inactives sur le plan catalytique vu les substitutions d'acides aminés au niveau de leurs sites catalytiques (Xie *et al.*, 1994).

6.2. Expression des PAG durant la gestation

Les protéines associées à la gestation les mieux connues aujourd'hui sont synthétisées par les cellules binucléées présentes dans les couches superficielles du trophoctoderme (Zoli *et al.*, 1992b), et plus précisément dans les granules de ces cellules binucléées (Zoli *et al.*, 1992b ; Xie *et al.*, 1991). Plusieurs membres de la famille des PAG sont exprimés dans les cellules du trophoctoderme dès le stade d'élongation du blastocyste ; ceci a été montré clairement chez l'espèce porcine (Do *et al.*, 2001 ; Szafranska *et al.*, 2002). Chez la vache, les cellules superficielles du trophoctoderme migrent en direction de l'épithélium utérin, puis fusionnent avec les cellules endothéliales pour donner naissance à des cellules trinuéées (Wooding et Beckers, 1987). Les cellules trinuéées ont une vie transitoire ; elles meurent après avoir largué le contenu des granules présents dans leur cytoplasme dans le sang maternel (Zoli *et al.*, 1992b).

Plusieurs équipes de chercheurs ont mené des investigations afin de déceler des relations entre les molécules PAG ou PSPB et une fonction immunologique locale. En effet, Dunbar et collaborateurs (1990) étudièrent l'influence de la PSPB sur l'état de neutrophiles stimulés par la concanavale A. Par ailleurs, Roberts et collaborateurs (1996) ont formulé plusieurs hypothèses dont celle selon laquelle les PAGs ou les molécules apparentées pourraient lier et séquestrer des peptides susceptibles d'être reconnus par le complexe majeur d'histocompatibilité, et ainsi exercer un rôle immunomodulateur au niveau de l'interface foeto-maternelle.

Toutes les investigations réalisées jusqu'à présent pour définir les fonctions des PAG ont été testées sur le modèle bovin. Austin et collaborateurs (1999) ont rapporté que l'augmentation de la concentration de PAG à la fin de la gestation est liée à l'augmentation d'une alpha chemokine. En 2000, Dosogne et collaborateurs ont attribué aux PAG la chute de résistance ainsi que la susceptibilité au

syndrome métrite mammite fréquemment observé chez la vache pendant la parturition ou dans les jours qui suivent cette époque. Parallèlement, des travaux menés par Moreira da Silva et collaborateurs (1997) et Dosogne et collaborateurs (2000) ont relaté notamment la succession des concentrations très élevées de PAG et la décroissance de l'activité d'oxydation des polymorphonucléaires neutrophiles. Par ailleurs, il a été montré que des concentrations de PAG1 supérieures à 1.800 ng/ml modifient la capacité des granulocytes à former des colonies myéloïdes et le taux global de clonage des cellules myéloïdes (Hoeben *et al.*, 2000). Cependant, à partir de ces expériences, il reste difficile de conclure aujourd'hui à une intervention déterminante des PAG sur l'état immunitaire de la mère même au moment où les niveaux sont les plus élevés c'est-à-dire peu avant la parturition, car en cette période, les concentrations d'oestrogènes sont également élevées.

Del Vecchio et collaborateurs (1990 ; 1995a,b) ont examiné l'effet de la protéine spécifique de la gestation B (PSPB) sur la production de progestérone (P4), de prostaglandine $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$), de PGE_2 et d'ocytocine sur des cultures de cellules lutéales. Ces auteurs ont rapporté différentes observations contradictoires sur l'action de PSPB sur les niveaux de production de la P4, avec parfois des effets directs sur la stimulation de la production de la P4 et parfois non. En revanche, il a été clairement établi que la PSPB stimule la production du PGE_2 qui, elle, est une molécule décisive pour la production lutéale de la P4 (Del Vecchio *et al.*, 1995a). D'ailleurs, d'autres études réalisées par le même groupe une année après, (Del Vecchio *et al.*, 1996) ont démontré que le traitement par la PSPB augmente la production lutéale de la P4. Ce même effet a été rapporté par Weems et collaborateurs (1998) concernant l'action de la PSPB sur la production de P4 par le corps jaune chez la vache au cours de la deuxième moitié de la gestation. Il a été ainsi majoritairement conclu que la PSPB pourrait avoir un rôle direct dans le maintien de l'activité du corps jaune

au cours de la gestation. Très récemment, une nouvelle approche nous a permis de présenter l'existence d'une relation possible entre la progestérone et les concentrations en PAG, pendant le premier trimestre de la gestation chez des vaches laitières. Dans cette étude, il a été observé que les concentrations en PAG aux jours 30, 45, 60 et 80 ont tendance à être plus hautes chez les vaches gestantes ayant des concentrations en progestérone plus élevées au jour 21 de la gestation (Ayad *et al.*, 2007b).

Les protéines spécifiques (de) ou associées à la gestation (PSPB, PSP60 ou PAG) ont été proposées pour la première fois pour le diagnostic de gestation chez les bovins (Butler *et al.*, 1982 ; Zoli *et al.*, 1991 ; Mialon *et al.*, 1993), puis ensuite, chez de nombreuses espèces de ruminants (Dobson *et al.*, 1993 ; Ranilla *et al.*, 1994 ; Karen *et al.*, 2003). Rapidement, il a été montré que ces protéines étaient présentes dans le sang maternel et que leur dosage RIA pouvait permettre un diagnostic précoce de gestation ainsi que l'étude de mortalité embryonnaire précoce ou tardive (Sasser *et al.*, 1986 ; Humblot *et al.*, 1988a, b ; Semambo *et al.*, 1992 ; Zoli *et al.*, 1992a ; Mialon *et al.*, 1993 ; Szenci *et al.* ; 1998a, b).

Les connaissances acquises sur les aspects relatifs à l'endocrinologie de la gestation, notamment dans le diagnostic, le suivi de la gestation et l'étude des mortalités embryonnaires, ont fortement évolué grâce au développement de différents systèmes de dosage RIA-PAG homologues (Sasser *et al.*, 1986 ; Humblot *et al.*, 1988a,b ; Zoli *et al.*, 1991a) et hétérologues (Perényi *et al.*, 2002a ; Ayad *et al.*, 2007a).

Les systèmes RIA homologues (RIA-PAG, -PSPB, -PSP60) ont été les premiers à avoir été utilisés pour le dosage de protéines associées à (ou spécifiques de) la gestation chez la vache. Ils ont été développés à partir de l'utilisation d'une même molécule pour l'immunisation, le radio marquage et la préparation de standard. Ces dosages sont actuellement les plus utilisés pour le diagnostic de gesta-

tion aussi bien sur des échantillons de sérum et de plasma (Sasser *et al.*, 1986 ; Humblot *et al.*, 1988a ; Zoli *et al.*, 1991 ; Mialon *et al.*, 1993) qu'expérimentalement dans le lait (Metelo *et al.*, 2002).

Quant aux systèmes hétérologues, ils ont été développés plus récemment à partir de l'utilisation de différents antisérums produits contre différentes formes de PAG caprines et ovines. Ces nouvelles formes de PAG ont été caractérisées comme ayant des masses moléculaires de 55 kDa, 57 kDa, 59 kDa et 62 kDa (caPAG₅₅, caPAG₅₉, caPAG₆₂, ovPAG₅₅, ovPAG₅₇, et ovPAG₅₉) et des séquences aminoterminales distinctes (Garbayo *et al.*, 1998 ; El Amiri *et al.*, 2003 ; 2004). Deux antisérums anti-PAG caprine (AS#706 : caPAG₅₅₊₆₂ ; AS#708 : caPAG₅₅₊₅₉) ont été utilisés avec succès pour le diagnostic de gestation et pour l'étude de la mortalité embryonnaire précoce chez la vache (Perényi *et al.*, 2002a). En outre, leur spécificité a été testée contre les principales protéases aspartiques susceptibles d'être présentes dans le sérum (Perényi *et al.*, 2002b). Récemment, nous avons testé trois nouveaux antisérums dont un pool d'antisérums dirigés contre les PAGs bovine (AS#497 : boPAG₆₇), ovine (AS#780 : ovPAG₅₇₊₅₉, AS#809 : ovPAG₅₅) et caprine, (AS#706 : caPAG₅₅₊₆₂). Cette étude a montré clairement que le diagnostic précoce de gestation à jour 30 après IA pourrait être amélioré en utilisant la combinaison de différents antisérums de PAG (AS#Pool). Les différents systèmes ont été contrôlés vis-à-vis de deux glycoprotéines placentaires d'origine humaine (hCG) et équine (PMSG) ainsi que vis-à-vis des hydrates de carbone les plus fréquemment retrouvées dans les glycoprotéines afin d'écarter toutes hypothèses d'interférences avec ces dernières (Ayad *et al.*, 2007a).

Chez la vache gestante, les concentrations en PAG sont détectables au plus tôt à partir des 19-22^e jours après conception pour atteindre des concentrations de 3 à 6 ng/ml aux alentours des 33-37^e jours de gestation (Perényi *et al.*, 2002a), avec cependant de grandes variations individuelles. D'un

point de vue pratique, cela signifie que cette protéine est détectable dans la circulation périphérique maternelle chez 98 à 99,2 % de femelles gravides à partir du 30^e jour après la conception (Zoli *et al.*, 1992a ; Lopez Gatus *et al.*, 2007). Pendant la gestation, les concentrations de PAG augmentent d'abord progressivement entre la 6^e et la 35^e semaine, pour ensuite s'élever plus rapidement entre la 35^e et le terme. Les valeurs maximales sont atteintes 1 à 5 jours avant la mise bas. Après le vêlage, les concentrations sériques de PAG décroissent progressivement et reviennent au dessous du seuil de détection (< 0,2 ng/ml) entre le 80^e et le 120^e jour post-partum (Zoli *et al.*, 1992a). Pendant cette période, le dosage de PAG est réalisable pour le diagnostic d'une nouvelle gestation mais à condition que l'intervalle vêlage insémination soit supérieur à 70 jours. La période nécessaire pour que la PAG devienne indétectable dans la circulation maternelle semble être due à une longue demi-vie de cette glycoprotéine allant de 7,3 à 8,4 jours (Sasser *et al.*, 1986 ; Kiracofe *et al.*, 1993).

Une étude réalisée sur des receveuses Holstein et Hereford auxquelles des embryons Holstein ont été transférés a permis la mise en évidence des influences de la race des receveuses, du sexe et de la famille du fœtus sur les concentrations périphériques de PAG (Guilbault *et al.*, 1991). Les concentrations moyennes *peripartum* ont été significativement plus élevées chez les vaches Hereford que chez les génisses et les vaches Holstein. De même, les receveuses Holstein porteuses de fœtus mâles ont présenté des concentrations de PAG plus élevées que celles porteuses de fœtus femelles (Guilbault *et al.*, 1991 ; Zoli *et al.*, 1992a). Plusieurs travaux ont rapporté qu'il existe également une relation entre les taux observés de PAG et les gestations simples ou multiples et le poids des veaux à la naissance (Dobson *et al.*, 1993 ; Mialon *et al.*, 1993 ; Patel *et al.*, 1997). Une approche originale a été développée récemment par Lopez Gatus et collaborateurs (2007a) qui ont démontré que les concentrations de PAG durant

la période précoce de gestation sont corrélées avec le jour de gestation, la production laitière, le nombre de fœtus et l'ascendance du fœtus chez les hautes productrices.

6.3. Applications cliniques des PAG

Les dosages de PAG devraient permettre de diagnostiquer plus précisément les altérations trophoblastiques survenant au cours de la gestation. Ces dosages pourraient être intégrés dans un système de suivi plus interactif des principales caractéristiques sanitaires et reproductives des troupeaux, incluant ainsi un traitement des résultats en temps réel.

Depuis quelques années, des investigations ont porté sur l'étude des mortalités embryonnaires après insémination artificielle (Szenci *et al.*, 1988b), saillie naturelle (Breukelman *et al.*, 2005a) ou transfert d'embryon (Breukelman *et al.*, 2005b). Dans ces études, des approches simultanées ont été utilisées : les dosages de progestérone et de PAG et un suivi par examen ultrasonographique. Ces études rapportent que les concentrations en PAG chutent chez des vaches dont la gestation a été initialement diagnostiquée par échographie comme positive et ensuite négative suite à une mortalité embryonnaire ou fœtale.

Plusieurs auteurs ont montré que suite à des programmes de manipulation d'embryons (clonage, transfert nucléaire, etc.), même si la plupart des nouveaux-nés ne présentent aucune anomalie particulière, une grande partie d'entre eux peut présenter un poids élevé à la naissance, associé ou non à la présence d'anomalies morphologiques tels que l'œdème du cordon ombilical et l'hypertrophie placentaire. Ces altérations semblent être à l'origine de concentrations très élevées en protéines placentaires à la fin de la gestation (Dobson *et al.*, 1993 ; Ectors *et al.*, 1996a, b). Dans le même contexte, Chavatte-Palmer et collaborateurs (2006) ont rapporté que les concentrations maternelles en PAG étaient statistiquement différentes entre les contrôles et les receveuses de clones dès le jour 34, suggérant une

synthèse anormale de glycoprotéines placentaires à un stade précoce chez les vaches gestantes par fécondation *in vitro* (FIV) indépendamment des gestations à terme. Ce travail fournit un outil pratique de suivi des gestations obtenues par FIV. Il suggère qu'en cas de sécrétion anormale des glycoprotéines placentaires, nous assistons d'abord à un retard de croissance du fœtus suivi d'un excès de développement de l'unité fœto-placentaire lors des étapes ultérieures de la gestation. De façon similaire, la présence d'un *Schistosomus reflexus* (embryon mal formé résultant d'une altération génétique au cours du développement embryonnaire) peut être caractérisée par des concentrations excessivement élevées de la PAG, lesquelles ont dépassé 12 000 ng/ml dans un cas suivi par Ectors et collaborateurs (1996a).

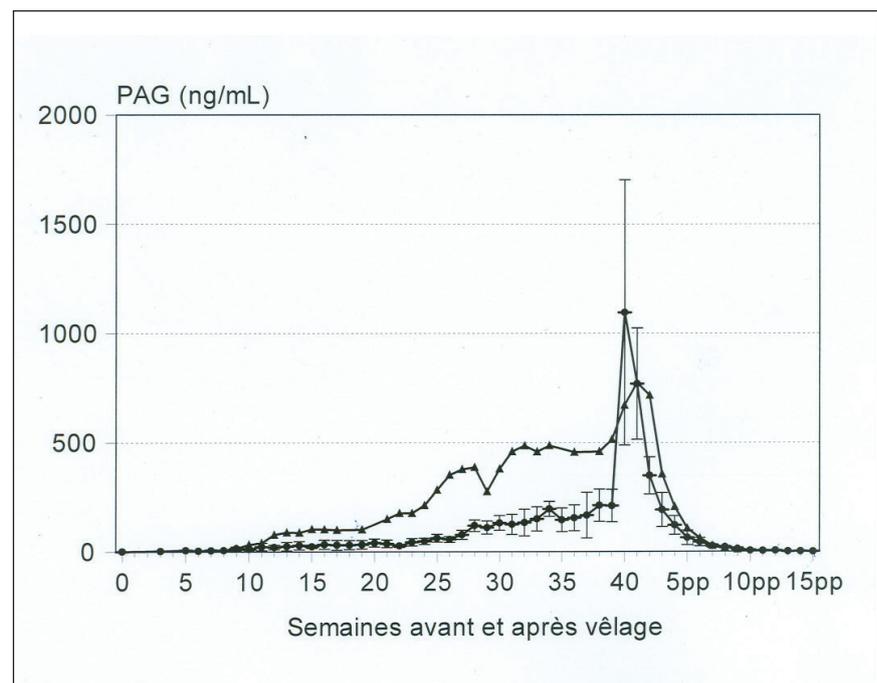
Les premières investigations portant sur l'effet d'infections par agents abortifs sur les concentrations de PAG ont été réalisées par Semambo et collaborateurs (1992). Ces auteurs ont démontré que les concentrations en protéines placentaires ou associées à

la gestation commencent à chuter 1 à 3 jours après l'infection expérimentale par *Actinomyces pyogenes*.

Plus tard, Zarrouk et collaborateurs (1999) ont relaté les résultats d'une étude similaire réalisée chez des chèvres gestantes, portant sur les variations plasmatiques de PAG suite à l'infection par *Toxoplasma gondii* et *Listeria monocytogenes*. Dans cette étude, chez les femelles infectées par *Listeria monocytogenes*, les concentrations de PAG chutaient brutalement dès le lendemain de l'inoculation et l'avortement survenait 9 jours plus tard, quant aux femelles infectées par *Toxoplasma gondii*, les concentrations de PAG diminuaient progressivement jusqu'au jour de l'expulsion fœtale. Plus récemment, Lopez-Gatius et collaborateurs (2007b) suggèrent que l'infection par *Neospora caninum* n'affecte pas la fonction placentaire chez les vaches du groupe qui n'avortent pas, bien qu'elles soient séropositives.

Un profil atypique des concentrations de PAG a été décrit chez la race zébu Azawak, souvent confrontée à une carence nutritionnelle au cours de la

Figure 3. Profil de concentration des protéines associées à la gestation (PAG) chez les vaches Zébu Azawak (n = 10) avec des gestations cliniquement normales (●) et chez une vache dont l'état corporel n'a cessé de se dégrader pendant la gestation (▲) (d'après Sousa *et al.*, 2003).



gestation (Sousa *et al.*, 2003). Cette situation concerne spécifiquement une vache dont l'état corporel n'a cessé de se dégrader pendant la gestation. Ses concentrations de PAG étaient 3 à 3,5 fois plus élevées que celles des vaches témoins faisant partie de la même étude (figure 3).

CONCLUSION

Les signaux embryonnaires constituent un domaine très riche de l'endocrinologie chez les ruminants. Pendant les deux dernières décennies, des équipes de chercheurs y ont apporté des précisions et davantage de compréhension. Dans cette revue de littérature, nous avons abordé quelques signaux embryonnaires de la gestation chez la vache en prêtant une attention particulière aux facteurs précoces et aux molécules exprimées tardivement et susceptibles de moduler l'endocrinologie maternelle. Dès aujourd'hui, nous pouvons retenir la multiplicité des signaux, leur spécificité et le caractère local et temporel de leur expression.

L'*Early Pregnancy Factor* a été proposé comme le révélateur le plus précoce de la grossesse et cela dès la fécondation (1 à 24 heures après fécondation). C'est à partir du EPF qu'a été développé le test de rosette. Néanmoins, ce test reste peu convaincant et d'une faible efficacité comme moyen de diagnostic de gestation. Dans le cas de l'Interferon- τ , c'est l'embryon qui émet un signal particulier et qui permet le maintien du corps jaune dès les premiers jours de la conception. Toutefois, sa produc-

tion locale au niveau utérin entrave l'utilisation du dosage dans le sang périphérique. Quant à l'hormone placentaire lactogène, le dosage s'avère peu intéressant pour le diagnostic de gestation et limite son usage à un diagnostic tardif.

Enfin, les protéines (spécifiques de) ou associées à la gestation appartiennent à la famille des protéases aspartiques. Cependant, la fonction enzymatique de ces PAG est inactive. Ces glycoprotéines sont sécrétées essentiellement par les cellules binucléées du trophoctoderme, et présentent des isoformes produites simultanément par le placenta durant la gestation. Actuellement, le dosage radioimmunologique des PAG, PSPB et PSP60 représente un moyen efficace de diagnostic précoce de gestation chez la vache (jour 27-30 après IA ou saillie naturelle). De surcroît, le dosage de ces protéines permet un suivi tout au long de la gestation apte à révéler des dysfonctionnements trophoblastiques pouvant mener à la mortalité embryonnaire ou à l'avortement.

REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent à remercier Mme R. Fares-Noucaïri pour sa collaboration à la rédaction de cette revue de littérature, ainsi que les journaux qui nous ont aimablement autorisés à reproduire les figures.

ABSTRACT

Endocrinology of pregnancy in the cow: embryonic signals, placental hormones and proteins

The development, the establishment and the embryonic survival at early stages of gestation are depending on an intimate dialogue between the embryo and his mother. For the embryo part, it is especially the trophoblast, or the future placenta, which plays a key role in initializing pregnancy. The placenta emits many signals of various chemical natures (steroids, prostaglandins, peptides, proteins), some of them, e.g. the interferon tau, determine the maintenance of the corpus luteum at the beginning of gestation. Until now, although having raised many speculations, the earliest of these signals were not identified in peripheral circulation. Consequently, they cannot be used as a pregnancy diagnosis or to indicate embryonic mortality. However, since the eighties, the specific proteins "associated with pregnancy", produced by the trophoblastic cells are used as tool for breeding management. Most of these molecules are present in peripheral circulation. In this review, we will describe the major mechanisms associated with the maternal recognition of the gestation and their possible applications as pregnancy diagnosis tool in the cow.

REFERENCES

- ARIMA Y., BREMEL R.D. Purification and characterization of bovine placental lactogen. *Endocrinology*, 1982, **113**, 2186-2194.
- ASSELIN E., FORTIER MA. Detection and regulation of the messenger for a putative bovine endometrial 9-keto-prostaglandin E2 reductase: effect of oxytocin and interferon-tau. *Biol. Reprod.*, 2000, **62**, 125-131.
- ATHANASAS-PLATSISS., QUINN K.A., WONG T.Y., ROLFE B.E., CAVANAGH A.C., MORTON H. Passive immunization of pregnant mice against early pregnancy factor causes loss of embryonic viability. *J. Reprod. Fertil.*, 1989, **87**, 495-502.
- ATHANASAS-PLATSISS S., MORTON H., DUNGLISON G.F., KAYE P.L. Antibodies to early pregnancy factor retard embryonic development in mice in vivo. *J. Reprod. Fertil.*, 1991, **92**, 443-451.
- ATHANASAS-PLATSISS S., CORCORAN CM, KAYE P.L., CAVANAGH A.C., MORTON H. Early pregnancy factor is required at two important stages of embryonic development in the mouse. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2000, **43**, 223-233.

- ATHANASAS-PLATSI S., ZHANG B., HILLYARD N.C., CAVANAGH A.C., CSURHES P.A., MORTON H., MCCOMBE P.A. Early pregnancy factor suppresses the infiltration of lymphocytes and macrophages in the spinal cord of rats during experimental autoimmune encephalomyelitis but has no effect on apoptosis. *J. Neurol. Sci.*, 2003, **214**, 27-36.
- ATKINSON Y.H., GOGOLIN-EWENS K.J., HOUNSEL E.F., DAVIES M.J., BRANDON M.R., SEAMARK R.F. Characterization of placentation-specific binucleate cell glycoproteins possessing a novel carbohydrate. *J. Biol. Chem.*, 1993, **268**, 26679-26685.
- AUSTIN K.J., KING C.P., VIERK J.E., SASSER R.G., HANSEN T.R. Pregnancy-specific protein B induces release of an alpha chemokine in bovine endometrium. *Endocrinology*, 1999, **140**, 452-455.
- AYAD A., SOUSA N.M., SULON J., IGUER-OUADA M., BECKERS J.F. Comparison of five radioimmunoassay systems for PAG measurement: ability to detect early pregnancy in cows. *Reprod. Dom. Anim.*, 2007a, doi: 10.1111/j.1439-0531.2006.00804.x.
- AYAD A., SOUSA N.M., SULON J., HORNICK J.L., WATTS J., LOPEZ-GATIUS F., IGUER-OUADA M., BECKERS J.F. Influence of progesterone concentrations on trophoblast and pituitary secretory functions during the first trimester of pregnancy in dairy cattle. *Theriogenology*, 2007b, **67**, 1503-1511.
- BAZER F.W. Establishment of pregnancy in sheep and pigs. *Reprod. Fertil. Dev.*, 1989, **1**, 237-242.
- BECKERS J.F., WOUTERS-BALLMAN P., FROMONT-LIENARD C., VAN ZWALMEN P., ECTORS F. Isolement d'une protéine placentaire présentant une activité analogue à la prolactine et à l'hormone de croissance. *Ann. Med. Vet.*, 1980, **124**, 584-601.
- BECKERS J.F., DE COSTER R., WOUTERS-BALLMAN P., FROMONT-LIENARD C., VAN ZWALMEN P., ECTORS F. Dosage radioimmunologique de l'hormone placentaire somatotrope et mammatrope bovine. *Ann. Med. Vet.*, 1982, **126**, 9-21.
- BECKERS J.F. L'hormone placentaire somato-mammatrope bovine. (Thèse d'agrégation universitaire). Université de l'État de Liège : Bruxelles, 1983, 207 p.
- BECKERS J.F., DEWULF M., VERSTEGEN J., WOUTERS-BALLMAN P., ECTORS F. Isolation of a bovine chorionic gonadotropin (bCG). *Theriogenology*, 1988a, **29**, 218.
- BECKERS J.F., WOUTERS-BALLMAN P., ECTORS F. Isolation and radioimmunoassay of a bovine pregnancy specific protein. *Theriogenology*, 1988b, **29**, 219.
- BJORKMAN N. Morphological and histochemical studies on the bovine placental. *Acta Anat.*, 1954, **22**: Suppl 22, 1-91.
- BOSHIER D.P. A histological and histochemical examination of implantation and early placentome formation in sheep. *J. Reprod. Fertil.*, 1969, **19**, 51-61.
- BREMEL R.D., SCHULER L.A. Bovine placental lactogen: structure and function. In: Neville M.C., Daniel C.W. (Eds), *The mammary gland: development, regulation and function*. Plenum Press : New York, 1987, 439-577.
- BREUKELMAN S.P., SZENCI O., BECKERS J.F., KINDAHL H., MULDER E.J., JONKER F.H., VAN DER WEIJDEN B., REVY D., POGANY K., SULON J., NEMEDI I., TAVERNE M.A. Ultrasonographic appearance of the conceptus, fetal heart rate and profiles of pregnancy-associated glycoproteins (PAG) and prostaglandin F2alpha-metabolite (PGF2alpha-metabolite) after induction of fetal death with aglepristone during early gestation in cattle. *Theriogenology*, 2005a, **64**, 917-933.
- BREUKELMAN S.P., PERÉNYI Z.S., DE RUIGH L., VAN WAGTENDONK-DE LEEUW A.M., JONKER F.H., VERNOOIJ J.C.M., BECKERS J.F., VANDER WEIJDEN G.C., VOS PLAM, DIELEMAN S.J., TAVERNE M.A.M. Plasma concentrations of bovine pregnancy-associated glycoprotein (bPAG) do not differ during the first 119 days between ongoing pregnancies derived by transfer of in vivo and in vitro produced embryos. *Theriogenology*, 2005b, **63**, 1378-1389.
- BUTLER J.E., HAMILTON W.C., SASSER R.G., RUDER C.A., HASS G.M., WILLIAMS R.J. Detection and partial characterization of two bovine pregnancy-specific proteins. *Biol. Reprod.*, 1982, **68**, 925-933.
- BUTTLE H.L., FORSYTH I.A. Placental lactogen in cow. *J. Endocrinol.*, 1976, **68**, 141-146.
- BUTTLE H.L., FORSYTH I.A., KNAGGS G. Plasma prolactin measured by radioimmunoassay and bioassay in pregnant and lactating goats the occurrence of a placental lactogen. *J. Endocrinol.*, 1972, **53**, 141-146.
- CAVANAGH A.C. Production in vitro of mouse early pregnancy factor and purification to homogeneity. *J. Reprod. Fertil.*, 1984, **71**, 581-592.
- CAVANAGH A.C., ROLFE B.E., ATHANASAS-PLATSI S., QUINN K.A., MORTON H. Relationship between early pregnancy factor, mouse embryo-conditioned medium and platelet-activating factor. *J. Reprod. Fertil.*, 1991, **93**, 355-65.
- CAVANAGH A.C., MORTON H. The purification of early-pregnancy factor to homogeneity from human platelets and identification as chaperonin 10. *Eur. J. Biochem.*, 1994, **222**, 551-560.
- CERUTTI R.A., LYONS W.R. Mammogenic activities of the mid-gestational mouse placenta. *Endocrinology*, 1960, **67**, 884-887.

- CHAN J.S.D., ROBERTSON H.A., FREISEN H.G. The purification and characterization of ovine placental lactogen. *Endocrinology*, 1976, **98**, 65-76.
- CHARPIGNY G., REINAUD P., HUET J.C., GUILLOMOT M., CHARLIER M., PERNOLLET J.C., MARTAL J. High homology between a trophoblastic protein (trophoblastin) isolated from ovine embryo and alpha-interferons. *FEBS Lett.*, 1988, **228**, 12-16.
- CHAVATTE-PALMER P., DE SOUSA N., LAIGRE P., CAMOUS S., PONTER A.A., BECKERS J.F., HEYMAN Y. Ultrasound fetal measurements and pregnancy associated glycoprotein secretion in early pregnancy in cattle recipients carrying somatic clones. *Theriogenology*, 2006, **66**, 829-840.
- CHEN X., ROSENFELD C.S., ROBERTS R.M., GREEN J. An aspartic proteinase expressed in the yolk sac and neonatal stomach of the mouse. *Biol. Reprod.*, 2001, **65**, 1092-1101.
- CHENG S-J, ZHENG Z-Q. Early pregnancy factor in cervical mucus of pregnant women. *Amer J. Reprod. Immunol.*, **51**, 102-105.
- CONTOPOULOS A.N., SIMPSON M.E. Growth-promoting activity of pregnant rat plasma after hypophysectomy and after thyroidectomy. *Endocrinology*, 1959, **64**, 1023-1031
- CORDOBA M.C., SARTORI R., FRICKE P.M. Assessment of a commercially available early conception factor (ECP) test for determining pregnancy status of dairy cattle. *J. Dairy. Sci.*, 2001, **84**, 1884-1889.
- DEL VECCHIO R.P., SASSER R.G., RANDEL R.D. Effect of pregnancy-specific protein B on prostaglandin F2 α and prostaglandin E2 release by day 16-perfused bovine endometrial tissue. *Prostaglandins*, 1990, **40**, 271-282.
- DEL VECCHIO R.P., SUTHERLAND W.D., SASSER R.G. Prostaglandin F2 α , progesterone and oxytocin production by cultured bovine luteal cells treated with prostaglandin E2 and pregnancy-specific protein B. *Prostaglandins*, 1995a, **50**, 137-150.
- DEL VECCHIO R.P., SUTHERLAND W.D., SASSER R.G. Effect of pregnancy-specific protein B on luteal cell progesterone, prostaglandin, and oxytocin production during two stages of the bovine estrous cycle. *J. Anim. Sci.*, 1995b, **73**, 2662-2668.
- DEL VECCHIO R.P., SUTHERLAND W.D., SASSER R.G. Bovine luteal cell production in vitro of prostaglandin E2, oxytocin and progesterone in response to pregnancy-specific protein B and prostaglandin F2 α . *J. Reprod. Fertil.*, 1996, **107**, 131-136.
- DO H.J., KIM J.H., ABEYDEERA L.R., HAN Y.M., MATTERN R.L., GREEN J.A., ROBERTS R.M., DAY B.N., PRATHER R.S. Expression of pregnancy-associated glycoprotein 1 and 2 genes in vivo, in vitro and parthenogenetically derived preimplantation pig embryos. *Zygote*, 2001, **9**, 245-250.
- DOBSON H., ROWAN T.G., KIPPAX I.S., HUMBLLOT P. Assessment of fetal number, and fetal an placental variability throughout pregnancy in cattle. *Theriogenology*, 1993, **40**, 411-425.
- DORÉ J.E.J., KATTESH H.G., GODKIN J.D. Isolation and identification of porcine embryonic basic protein as a fragment of pregnancy-associated glycoprotein-2. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 1996, **28**, 1249-1255.
- DOSOGNE H., MASSART-LEEN A.M., BURVENICH C. Immunological aspects of pregnancy-associated glycoproteins. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2000, **480**, 295-305.
- DUNBAR M.M., WONG T.S., RUDER-MONTGOMERY C.A., CHEW B.P., SASSER R.G. Partial characterization of the immunosuppressive properties of pregnancy-specific protein B (PSPB). *Theriogenology*, 1990, **60**, 187-191.
- ECTORS F.J., DRION P.V., DELVAL A., SMITH L.C., SULON J., ZAAIJER D., SZENCIO., REMY B., BECKERS J.F., ECTORS F. Interests of pregnancy follow-up cows after embryo transfer special focusing on IVP and NT origin. In : 12nd Annual Meeting de l'Association européenne de Transfert embryonnaire, 13-14 septembre 1996, Lyon, France. Association européenne de Transfert embryonnaire : Lyon, 1996a, 95-102.
- ECTORS F.J., SCHMIDT M., SULON J., DELVAL A., REMY B., AVERY B., BECKERS J.F. bPAG profiles in recipient heifers after transfer of IVF and nuclear transfer embryos (Abstract). *Theriogenology*, 1996b, **45**, 283.
- EL AMIRI B., REMY B., SOUSA N.M., JORIS B., OTTHIERS N.G., PERÉNYI Z., BANGAMBOKO H., BECKERS J.F. Isolation and partial characterization of three pregnancy-associated glycoproteins from the ewe placenta. *Mol. Reprod. Dev.*, 2003, **64**, 199-206.
- EL AMIRI B., REMY B., SOUSA N.M., BECKERS J.F. Isolation and characterization of eight pregnancy-associated glycoproteins present at high levels in the ovine placenta between day 60 and day 100 of gestation. *Reprod. Nutr. Dev.*, 2004, **44**, 169-181.
- FARIN C.E., IMAKAWA K., HANSEN T.R., MCDONNELL J.J., MURPHY C.N., FARIN P.W., ROBERTS R.M. Expression of trophoblastic interferon genes in sheep and cattle. *Biol. Reprod.*, 1990, **43**, 210-218.
- FORSYTH I.A. Variation among species in the endocrine control of mammary growth and function: the role of prolactin, growth hormone and placental lactogen. *J. Dairy. Sci.*, 1986, **69**, 886-903.
- GAN X., XIE S., ROBERTS R.M. Identification of transcripts for pregnancy-associated glycoprotein (PAG) in carnivora and perissodactyla (Abstract). *Biol. Reprod.*, 1997, **56**, 431.

- GANDY B., TUCKER W., RYAN P., WILLIAMS A., TUCKER A., MOORE A., GODFREY R., WILLARD S. Evaluation of the early conception factor (ECF) test for the detection of nonpregnancy in dairy cattle. *Theriogenology*, 2001, **56**, 637-47.
- GARBAYO J.M., REMY B., ALABART J.L., FOLCH J., WATTIEZ R., FALMAGNE P., BECKERS J.F. Isolation and partial characterization of a pregnancy-associated glycoprotein family from the goat placenta. *Biol. Reprod.*, 1998, **58**, 109-115.
- GILTLIN D., BOESMEN M. Sites of serum alpha-fetoprotein synthesis in the human and in the rat (Abstract). *J. Clin. Invest.*, 1967, **46**, 1010.
- GREEN J.A., XIE S., SZAFRANSKA B., GAN X., NEWMAN A.G., MCDOWELL K., ROBERTS R.M. Identification of a new proteinase expressed by the outer chorionic cell layer of the equine placenta. *Biol. Reprod.*, 1999, **60**, 1069-1077.
- GUILBAULT L.A., BECKERS J.F., ROY G.L., GRASSO F. Plasma concentrations of bovine placental lactogen, prolactin and prostaglandins during the periparturient period in Ayrshire heifers bearing different breeds of fetus. *Theriogenology*, 1988, **29**, 255.
- GUILBAULT L.A., BECKERS J.F., LAPIERRE S., ZOLI A.P., BENITER-ORTIZ W., ROY G.L. Peripartum concentrations of placental protein hormones (hPL and bPAG) in Holstein and Hereford recipients carrying purebred Holstein fetuses (Abstract). *Theriogenology*, 1991, **35**, 208.
- GUILLOMOT M. L'implantation du blastocyste. In : Thibault C., Levasseur M.C. (Eds), La reproduction chez les mammifères et l'homme. 2^e Ed. Ellipses: Paris, 2001, 457-478.
- HANDWERGER S., MAURER W., BARRET J., HURLEY W., FELLOWS R.E. Evidence of homology between ovine and human placental lactogens. *Endocr. Res. Comm.*, 1974, **1**, 403-413.
- HANSEN T.R., AUSTIN K.J., PERRY D.J., PRUJ.K., TEIXHEIRA M.G., JOHNSON G.A. Mechanism of action of interferon-tau in the uterus during early pregnancy. *J. Reprod. Fertil.*, 1999, **54**, 329-339.
- HARNESS J., CAVANAGH A., MORTON H., MCCOMBE P. A protective effect of early pregnancy factor on experimental autoimmune encephalomyelitis induced in Lewis rats by inoculation with myelin basicprotein. *J. Neurol. Sci.*, 2003, **216**, 33-41.
- HAYDEN T.J., THOMAS C.R., FOSYTH I.A. Effect of number of young born (litter size) on milk yield of goats: role for placental lactogen. *J. Dairy. Sci.* 1979, **62**, 53-57.
- HOEBEN D., MONFARDINI E., OPSOMER G., BURVENICH C., DOSOGNE H., DE KRUIF A., BECKERS J.F. Chemiluminescence of bovine polymorphonuclear leukocytes during the periparturient period and relation with metabolic markers and bovine pregnancy-associated glycoprotein. *J. Dairy. Res.*, 2000, **67**, 249-259.
- HUMBLOT P. Signaux embryonnaires et contrôle de la gestation des ruminants. *Rec. Med. Vét.*, 1991, **167**, 193-202.
- HUMBLOT P., CAMOUS S., MARTAL J., CHARLERY J. JEANGUYOT N., THIBIER M., SASSER R.G. Pregnancy-specific protein B, progesterone concentrations and embryonic mortality during early pregnancy in dairy cows. *J. Reprod. Fertil.*, 1988a, **83**, 215-223.
- HUMBLOT P., CAMOUS S., MARTAL J., CHARLERY J. JEANGUYOT N., THIBIER M., SASSER R.G. Diagnosis of pregnancy by radioimmunoassay of a pregnancy-specific protein in the plasma of dairy cows. *Theriogenology*, 1988b, **30**, 257-268.
- HUMBLOT P., DALLA PORTA M.A. Effect of conceptus removal and intrauterine administration of conceptus tissue on luteal in the cow. *Reprod. Nutr. Dev.*, 1984, **24**, 529-541.
- IMAKAWA K., ANTHONY R.V., KAZEMI M., MAROTTI K.R., POLITES H.G., ROBERTS R.M. Interferon-like sequence of ovine trophoblast protein secreted by embryonic trophoblast. *Nature*, 1987, **330**, 377-379.
- JOSIMOVICH J.B., MACLAREN A. Presence in the human placenta and term serum of a highly lactogenic substance immunologically related to pituitary growth hormone. *Endocrinology*, 1962, **71**, 209-220.
- KAREN A., BECKERS J.F., SULON J., SOUSA N.M., SZABADOS K., RECZIGEL J., SZENCI O. Early pregnancy diagnosis in sheep by progesterone and pregnancy-associated glycoprotein tests. *Theriogenology*, 2003, **59**, 1941-1948.
- KIRACOFE G.H., WRIGHT J.M., SCHALLES R.R., RUDER C.A., PARISH S., SASSER R.G. Pregnancy-specific protein B in serum of postpartum beef cows. *J. Anim. Sci.*, 1993, **71**, 2199-2205.
- KUBISCH H.M., LARSON M.A., EALY A.D., MURPHY C.N., ROBERTS R.M. Genetic and environmental determinants of interferon-tau secretion by in vivo- and in vitro-derived bovine blastocysts. *Anim. Reprod. Sci.*, 2001, **66**, 1-13.
- LABONNARDIERE C., MARTINAT-BOITEF, TERQUIM, LEFEVRE F., ZOUARI K., MARTAL J., BAZER F.W. Production of two species of interferon by large white and meishan pig conceptus during the peri-attachement period. *J. Reprod. Fertil.*, 1991, **91**, 469-478.
- LEE C.S., WOODING F.B., BRANDON M.R. Immunogold co-localization of ovine placental lactogene and antigen recognized by the SBU-3 monoclonal antibody in sheep placental granules. *J. Reprod. Fertil.*, 1986, **78**, 653-662.
- LOPEZ-GATIUS F., GARBAYO J.M., SANTOLARIA P., YANIZ J., AYAD A., SOUSA N.M., BECKERS J.F. Milk production correlates negatively with plasma

- levels of pregnancy-associated glycoprotein (PAG) during the early fetal period in high producing dairy cows with live fetuses. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 2007, **32**, 29-42.
- LOPEZ-GATIUS F., GARBAYO J.M., SANTOLARIA P., YANIZ J.L., ALMERIA S., AYAD A., DE SOUSA N.M., BECKERS J.F. Cross-breed pregnancies were associated with higher plasmatic pregnancy-associated glycoprotein (PAG) concentration throughout gestation in *Neospora*-seropositive dairy cows. *Theriogenology*, 2007, **67**, 502-508.
- LYNCH K.A., ALEXANDER R.M., SASSER R.G. The cloning expression of the bovine pregnancy specific protein B (bPSPB) gene. *Biol. Reprod.*, 1992, **46**, 73 (Abstract).
- MARTAL J., DJIANE J. Purification of a lactogenic hormone in sheep placenta. *Bioch. Biophys. Res. Comm.*, 1975, **65**, 770-778.
- MARTAL J., LACROIX M.C., LOURDES C., SAUNIER M. WINTERBERGER-TORRES S. Trophoblastin an antiluteolytic protein present in early pregnancy in sheep. *J. Reprod. Fertil.*, 1979, **56**, 63-73.
- MARTAL J., CEDARD L. Endocrinologie placentaire. In : Thibault C., Levasseur M.C. (Eds), La reproduction chez les mammifères et l'homme. Ellipses: Paris, 1993, 435-479.
- METELO R. SULON J., MOREIRA DA SILVA F., BECKERS J.F. Preliminary results for measuring bovine PAG in milk simples. In : 7^{ème} Journée de Rencontre Bioforum, BioLiège, Association des Biotechnologistes Liégeois, Liège, 3 May 2002, 32 (Abstract).
- MIALON M.M., CAMOUS S., RENAND G., MARTAL J., MENISSIER F. Peripheral concentrations of a 60-kDa pregnancy serum protein during gestation and after calving and in relationship to embryonic mortality in cattle. *Reprod. Nutr. Dev.*, 1993, **33**, 269-282.
- MOOR M., ROWSON L.E. Local uterine mechanisms affecting luteal function in the sheep. *J. Reprod. Fertil.*, 1966, **11**, 307-310.
- MOREIRA DA SILVA F., BURVENICH C., PAAPE M.J., BECKERS J.F., LEEN A.M. Effect of cortisol, estradiol, progesterone and pregnancy-associated glycoprotein on oxidative burst (OB) activity of bovine neutrophils (PMN). In : 32nd National Meeting of the Society for Leukocyte Biology, Baltimore, USA, 04-07 December 1997. Society for Leukocyte Biology: Bethesda, 1997, 214.
- MORGAN G., WOODING FB, GODKIN JD. Localization of bovine trophoblast protein-1 in the cow blastocyst during implantation: an immunological cryoultrastructural study. *Placenta*, 1993, **14**, 641-649.
- MORTON H., HEGH V., CLUME G.J.A. Immunosuppression detected pregnant mice by rosette inhibition test. *Nature*, 1974, **249**, 459-460.
- MORTON H., MORTON D.J., ELLENDORFF F. The appearance and characteristics of early pregnancy factor in the pig. *J. Reprod. Fertil.*, 1983, **68**, 437-446.
- MORTON H., ROLFE B.E. CAVANAGH A.C. Ovum factor and early pregnancy factor. In: McLaren A, Siracusa G. (Eds), Current Topics in Developmental Biology - volume 23. Academic Press : San Diego, 1987, 73-92.
- MORTON H., CAVANAGH A.C., ATHANASAS-PLATSIS S., QUINN K.A., ROLFE B.E. Early pregnancy factor has immunosuppressive and growth factor properties. *Reprod. Fertil. Dev.*, 1992, **4**, 411-422.
- MORTON H. Early pregnancy factor: an extracellular chaperonin 10 homologue. *Immunol. Cell Biol.*, 1998, **76**, 483-496.
- MORTON H., MCKAY D.A., MURPHY R.M., SOMODEVILLA-TORRES M.J., SWANSON C.E., CASSADY A.I., SUMMERS K.M., CAVANAGH A.C. Production of a recombinant form of early pregnancy factor that can prolong allogeneic skin graft survival time in rats. *Immunol. Cell Biol.*, 2000, **78**, 603-607.
- MURTHY G.S., SCHELLENBERG C., FREISEN H.G. Purification and characterization of bovine placental lactogen. *Endocrinology*, 1982, **111**, 2117-2124.
- OHNUMA K., ITO K., TAKAHASHI J., NAMBO Y., MIYAKE Y. Partial purification of mare early pregnancy factor. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2004, **51**, 95-101.
- PATEL OV, HIRAKO M, TAKAHASHI T, SASAKI N, DOMEKI I. Plasma bovine placental lactogen concentration throughout pregnancy in the cow; relationship to stage of pregnancy, fetal mass, number and postpartum milk yield. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 1996, **44**, 231-237.
- PATEL O.V., SULON J., BECKERS J.F., TAKAHASHI T., HIRAKO M., SASAKI N., DOMEKI I. Plasma bovine pregnancy-associated glycoprotein concentrations through gestation in relationship fetal number in the cow. *Eur. J. Endocrin.*, 1997, **137**, 423-428.
- PERÉNYI Z., SZENCI O., DRION P.V., BANGA-MBOKO H., SOUSA N.M., EL AMIRI B., BECKERS J.F. Aspartic proteinase members secreted by the ruminant placenta: specificity of three radioimmunoassay systems for the measurement of pregnancy-associated glycoproteins. *Reprod. Dom. Anim.*, 2002a, **37**, 324-329.
- PERÉNYI Z., SZENCI O., SULON J., DRION P.V., BECKERS J.F. Comparison of the ability of three radioimmunoassays to detect pregnancy-associated glycoproteins in bovine plasma. *Reprod. Dom. Anim.*, 2002b, **37**, 100-104.
- QUINN K.A., ATHANASAS-PLATSIS S., WONG T.Y., ROLFE B.E., CAVANAGH A.C., MORTON H. Monoclonal antibodies to early pregnancy factor perturb tumour cell growth. *Clin. Exp. Immunol.* 1990, **80**, 100-108.

- QUINN K.A., CAVANAGH A.C., HILLYARD N.C., MCKAY D.A., MORTON H. Early pregnancy factor in liver regeneration after partial hepatectomy in rats: relationship with chaperonin 10. *Hepatology*, 1994, **20**, 1294-302.
- RANILLA M.J., SULON J., CARRO M.D., MANTECON A.R., BECKERS J.F. Plasmatic profiles pregnancy-associated glycoproteins and progesterone levels during gestation in Churra and Merino sheep. *Theriogenology*, 1994, **42**, 537-545.
- REDDY S., WALKINS W.B. Immunofluorescent localization of ovine placental lactogen. *J. Reprod. Fertil.*, 1978, **52**, 173-174.
- REIMERS T.J., SASSER R.G., RUDER C.A. Production of pregnancy-specific protein by bovine binucleate trophoblastic cells. *Biol. Reprod.*, 1985, **32** (suppl. 1), 55.
- ROBERTS R.M. A novel group of interferons associated with the early ovine and bovine embryos. *J. Interferon Res.*, 1989, **9**, 373-378.
- ROBERTS R.M., CROSS J.C., LEAMAN D.W. Interferons as hormones of pregnancy. *Endocr. Rev.*, 1992, **13**, 432-452.
- ROBERTS R.M., XIE S., MATHIALAGAN N. Maternal recognition of pregnancy. *Biol. Reprod.*, 1996, **54**, 294-302.
- ROBERTSON M.C., SCHROEDTER I.C., FREISEN H.G. Molecular cloning and expression for rat placental lactogen-IV a variant of rPL-I present in late pregnant rat placenta. *Endocrinology*, 1991, **129**, 2746-2756.
- ROWSON L.E., MOOR M. the influence of embryonic tissue homogenate infused into the uterus, on the life-span of the corpus luteum in the sheep. *J. Reprod. Fertil.*, 1967, **13**, 511-516.
- SAKAL E., BIGNON C., CHAPUIK-COHEN N., DANIEL N., PALY J., BELAIR J., DJIANE J., GERTLER A. Cloning preparation and characterization of biologically active recombinant caprine placental lactogen. *J. Endocrinol.*, 1998, **159**, 509-518.
- SASSER R.G., RUDER C.A., IVANI K.A., BUTLER J.E., HAMILTON W.C. Detection of pregnancy by radioimmunoassay of a novel pregnancy-specific protein in serum of cows and a profile of serum concentrations during gestation. *Biol. Reprod.*, 1986, **35**, 936-942.
- SASSER R.G., CROCK J., RUDER C.A. Characteristics of pregnancy-specific protein B in cattle. *J. Reprod. Fertil.*, 1989, **37**, 109-113.
- SCHULER L.A., SHIMOMURA K., TNAKA M., NAKASHIMA K. Nomenclature classification for the bovine placental prolactin-related hormones. *Endocrinology*, 1991, **129**, 2057.
- SELYE H., COLLIP J.B., THOMSON D.L. The effect of hypophysectomy upon pregnancy and lactation. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. N.Y.*, 1933, **30**, 589-592.
- SEMAMABO D.K.N., ECKERSALL P.D., SASSER R.G., AYLIFFE T.R. Pregnancy-specific protein B and progesterone in monitoring viability of the embryo in early pregnancy in the cow after experimental infection with *Actinomyces pyogenes*. *Theriogenology*, 1992, **37**, 741-748.
- SHIMOMURA K., BREMEL R.D. Characterization of bovine placental lactogen as a glycoprotein with N-linked and O-linked carbohydrate side chains. *Mol. Endocrinol.*, 1988, **2**, 845-853.
- SOUSA N.M., ZONGO M., PITALLA W., BOLY H., SAWADOGO L., SANON M., FIGUEIREDO J.R., GONÇALVES P.B.D., EL AMIRI B., PERÉNYI Z., BECKERS J.F. Pregnancy-associated glycoprotein concentrations during pregnancy and the postpartum period in Azawak zebu cattle. *Theriogenology*, 2003, **59**, 1131-1142.
- SZAFRANSKA B., MIURA R., GHOSH D., EZASHI T., XIE S., ROBERTS R.M., GREEN J.A. Gene for porcine pregnancy-associated glycoprotein 2 (poPAG2): its structural organization and analysis of its promoter. *Mol. Reprod. Dev.*, 2001, **60**, 137-146.
- SZAFRANSKA B., PANASIEWICZ G. The placental expression of the porcine pregnancy-associated glycoprotein (pPAG) gene family examined *in situ* and *in vitro*. *Anim. Reprod. Sci.*, 2002, **72**, 95-113.
- SZAFRANSKA B., XIE S., GREEN J., ROBERTS R.M. Porcine pregnancy-associated glycoproteins; new members of the aspartic proteinase gene family expressed in the trophoctoderm. *Biol. Reprod.*, 1995, **53**, 21-28.
- SZENCI O., BECKERS J.F., SULON J., SASSER G., TAVERNE M.A.M., VARGA J., BALTUSEN R., SCHEKK G. Comparison of ultrasonography, bovine pregnancy specific B, and bovine pregnancy-associated glycoprotein 1 test for pregnancy detection in dairy cows. *Theriogenology*, 1988a, **50**, 77-88.
- SZENCI O., TAVERNE M.A.M., SULON J., BECKERS J.F., VARGA J., BORZSONYI L., HANZEN C., SCHEKK G. Evaluation of false ultrasonographic pregnancy diagnoses in cows by measuring plasma levels of bovine pregnancy associated glycoprotein 1 (bPAG1). *Vet. Rec.*, 1988b, **142**, 304-306.
- USHIZAWA K., HERATH C.B., KANEYAMA K., SHIOJIMA S., HIRASAWA A., TAKAHASHI T., IMAI K., OCHIAI K., TOKUNAGA T., TSUNODA Y., TSUJIMOTO G., HASHIZUME K. cDNA microarray analysis of bovine embryo gene expression profiles during the pre-implantation period. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 2004, **2**, 77.
- VERSTEGEN J., FELLMANN D., BECKERS J.F. Immunodetection of bovine chorionic somatomammotrophin (bCS). *Acta Endocrinol.*, 1985, **109**, 403-410.
- WANGO E.O., HEAP R.P., WOODING F.B. Regulation of steroid synthesis and metabolism in isolated binucleate cells of the placenta in sheep and goats. *J. Reprod. Fertil.*, 1992, **109**, 53-58.

- WEEMS Y.S., LAMMOGLIA M.A., VERA-AVILA H.R., RANDEL R.D., KING C., SASSER R.G., WEEMS C.W. Effect of Luteinizing hormone (LH), PGE2, 8-EPI-PGE1, 8-EPI-PGE2, trichosanthin and pregnancy specific protein B (PSPB) on secretion of progesterone *in vitro* by corpora lutea (CL) from nonpregnant cows. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, 1998, **55**, 27-42.
- WOODING F.B. Role of binucleate cells in fetomaternal cell fusion at implantation in the sheep. *Am. J. Anat.*, 1984, **170**, 233-250.
- WOODING F.B. Current topic: the synepitheliochorial placenta of ruminant: binucleate cell fusions and hormone production. *Placenta*, 1992, **13**, 101-113.
- WOODING F.B.P., BECKERS J.F. Trinucleate cells and the ultrastructural localisation of bovine placental lactogen. *Cell Tissue Res.*, 1987, **247**, 667-673.
- WOODING F.B., MORGAN G., MONAGHAN S., HAMON M., HEAP R.P. Functional specialization in the ruminant placenta: evidence for two populations of fetal binucleate cells of different selective synthetic capacity. *Placenta*, 1996, **17**, 75-86.
- WOODING F.B., WATHES D.C. Binucleate cell migration in the bovine placentome. *J. Reprod. Fertil.*, 1980, **59**, 425-430.
- XIE S., LOW B.G., NAGEL R.J., KRAMER K.K., ANTHONY R.V., ZOLI A.P., BECKERS J.F., ROBERTS R.M. Identification of the major pregnancy specific antigens of cattle and sheep as inactive members of the aspartic proteinase family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, **88**, 10247-10251.
- XIE S., LOW B.G., NAGEL R.J., BECKERS J.F., ROBERTS R.M. A novel glycoprotein of the aspartic proteinase gene family expressed in bovine placental trophoderm. *Biol. Reprod.*, 1994, **51**, 1145-1153.
- YAMAKAWA M., TANAKA M., KOYAMA M., KAGESTO Y., WATHIKI M., YAMAMOTO M., NAKASHIMA K. Expression of new members of the prolactin growth hormone gene family in bovine placenta: isolation and characterization of two prolactin-like cDNA clones. *J. Biol. Chem.*, 1990, **265**, 8915-8920.
- ZARROUK A., ENGELAND I., SULON J., BECKERS J.F. Pregnancy-associated glycoprotein levels in pregnant goats inoculated with *Toxoplasma gondii* or *Listeria monocytogenes*: a retrospective study. *Theriogenology*, 1999, **52**, 1105-1114.
- ZHANG B., HARNESS J., SOMODEVILLA-TORRES M.J., HILLYARD N.C., MOULD A.W., ALEWOOD D., LOVE S.G., ALEWOOD P.F., GREER J.M., CAVANAGH A.C., MCCOMBE P.A., MORTON H. Early pregnancy factor suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis induced in Lewis rats with myelin basic protein and in SJL/J mice with myelin proteolipid protein peptide 139-151. *J. Neurol. Sci.*, 2000, **182**, 5-15.
- ZHANG B., WALSH M.D., NGUYEN K.B., HILLYARD N.C., CAVANAGH A.C., MCCOMBE P.A., MORTON H. Early pregnancy factor treatment suppresses the inflammatory response and adhesion molecule expression in the spinal cord of SJL/J mice with experimental autoimmune encephalomyelitis and the delayed-type hypersensitivity reaction to trinitrochlorobenzene in normal BALB/c mice. *J. Neurol. Sci.*, 2003, **212**, 37-46.
- ZOLI A.P., BECKERS J.F., WOUTERS-BALLMAN P., CLOSSET J., FALMAGNE P., ECTORS F. Purification and characterization of a bovine pregnancy-associated glycoproteins. *Biol. Reprod.*, 1991, **45**, 1-10.
- ZOLI A.P., DEMEZ P., BECKERS J.F., REZNIK M., BECKERS A. Light and electron microscopic immunolocalization of bovine pregnancy-associated glycoprotein in the bovine placentome. *Biol. Reprod.*, 1992a, **46**, 623-629.
- ZOLI A.P., GUILBAULT L.A., DELAHAUT P., BENITEZ ORTIZ W., BECKERS J.F. Radioimmunoassay of a bovine pregnancy-associated glycoprotein in serum: its application for pregnancy diagnosis. *Biol. Reprod.*, 1992b, **46**, 83-92.